

虹彩色素上皮細胞および網膜色素上皮細胞における 内向き整流性カリウムチャネルの発現

著者	安田 佳奈子
号	2133
発行年	2004
URL	http://hdl.handle.net/10097/22678

氏 名 (本籍) ^{やす}安 ^た田 ^か佳 ^な奈 ^こ子

学位の種類 博士（医学）

学 位 記 番 号 医 博 第 2 1 3 3 号

学位授与年月日 平成 16 年 3 月 25 日

学位授与の条件 学位規則第4条第1項該当

研 究 科 専 攻 東北大学大学院医学系研究科
 (博士課程) 医科学専攻

学位論文題目 Expression and Functional Properties of
Unique Inward Rectifier K⁺ channel Kir7.1 in
the Porcine Iris and Retinal Pigment Epithe-
lium
（虹彩色素上皮細胞および網膜色素上皮細胞にお
ける内向き整流性カリウムチャネルの発現）

(主 査)

論文審査委員 教授 玉 井 信 教授 丸 山 芳 夫

教授 八 尾 寛

論文内容要旨

黄斑変性症や網膜色素変性症といった網膜難治疾患では、網膜色素上皮細胞（RPE）の不可逆的機能障害に主たる原因が存在することが多くの研究によりわかってきた。近年、基礎研究と硝子体手術手技の進歩に伴い、機能不全に陥った RPE を補填するべく、正常な機能を有する RPE を網膜下に移植する試みがなされているが、同種移植は侵襲が大きく、また異種移植では拒絶反応が問題とされている。そこで、同種移植として、発生起源を RPE と同じく神経外胚葉にもち、かつ、比較的侵襲が少なく得ることが出来る虹彩色素上皮細胞（IPE）を RPE の代用細胞とする方法が臨床応用されている。しかしながら IPE はその機能についてはほとんど検討されておらず、特に膜チャネルコンダクタンスは全く報告がない。今回の研究ではブタ IPE と RPE を急性単離し、膜チャネルコンダクタンスを比較検討した。さらに、ヒトやウシの RPE に主に発現し、その膜の性質を代表している特殊な内向き整流性カリウムチャネル（Kir）である Kir7.1 サブユニットが IPE に発現しているかを合わせて検討した。

ブタ眼球より急性単離した IPE および RPE を用い、電位固定によるホールセルパッチクランプ法を用いて細胞膜全電流を計測した。刺激電位は保持電位 0 mV より +50 mV から -150 mV まで 10 mV ステップで 500 ms で行った。細胞内液は 140 mM K^+ 、4 mM ATP を含み、細胞外液は標準溶液を 5 mM K^+ 、135 mM Na^+ を含むものとした。膜通過全電流は IPE、RPE とともに内向き整流性を示したため、5 mM Ba^{2+} を含む外液にて内向き整流性電流を阻害し、その差を Kir 電流とした。Kir7.1 チャネルは他の Kir チャネルに比べ特異な性質を有しており、それは弱い整流性、弱い細胞外 K^+ 濃度依存性、そして本来通過しにくい Rb^+ に対する高い透過性である。したがって、細胞外液の K^+ 濃度を変化させ、Kir 電流の K^+ 濃度依存性を調べた。さらに K^+ および Rb^+ に対する透過性を検討した。一方 IPE および RPE における Kir7.1 mRNA の存在を RT-PCR 法により検討し、IPE より得られた増幅産物を direct sequence 法によりヒト Kir7.1 mRNA との相同性を調べた。

標準溶液下で IPE の細胞膜全電流は弱い内向き整流性を示し、5 mM Ba^{2+} 添加液によりほぼ抑制された。クランプ後の静止膜電位は IPE では -76.6 ± 5.9 mV ($n=8$)、RPE でも -77.5 ± 4.1 mV ($n=7$) であり、細胞内外の K^+ 濃度差による平衡電位 -83 mV に近似していた。膜抵抗、および膜キャパシタンスは IPE では 11.5 ± 9.1 M Ω および 38.7 ± 12.6 pF ($n=18$)、これに対し RPE では 7.8 ± 6.2 M Ω および 24.9 ± 10.7 pF であった。 $-130 \sim -150$ mV における内向きコンダクタンスの膜キャパシタンスに対する比は IPE で 21.7 S/F、一方 RPE では 205.6 S/F であり、IPE では RPE のほぼ 10% であった。細胞外 K^+ の濃度上昇に伴い逆転電位は脱分極側に移動し、これは細胞内外の K^+ 濃度差による平衡電位の動きとほぼ一致していた。これは K^+ 選

択性チャネルであることを意味する。しかしながら K^+ に対する濃度依存性は RPE 同様 IPE もほぼ認められなかった。IPE において、 Rb^+ の K^+ に対する透過性は平衡電位付近では 0.96 ± 0.04 、RPE では 0.94 ± 0.08 とほぼ等しく、また過分極（内向き）側においては 7.04 ± 1.7 と特異的に高く、これは RPE の 8.78 ± 1.2 と近似していた。Kir7.1 mRNA は RPE、IPE ともに発現しており、IPE からの増幅産物はヒト Kir7.1 mRNA と 96.3% 一致していた。

本研究から IPE では主として Kir チャネルが機能的に発現していることがはじめて示され、またそれは RPE に特異的かつ優位に発現している膜チャネルである Kir7.1 であることが分子生物学的にも判明した。しかしながらその機能的発現は RPE の 10 分の 1 以下であり、網膜下の RPE と同程度でそれに代わる機能を果たすに十分とは思えず、IPE に RPE の機能を代用させるためには、今後 Kir7.1 チャネルの発現制御などを検討する必要があると考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は黄斑変性症や網膜色素変性症といった網膜難治疾患において、網膜色素上皮細胞 (RPE) の不可逆的機能障害に主たる原因であることが明らかになりつつあり、その治療法として発生起源を RPE と同じく神経外胚葉にもち、かつ、比較的侵襲が少なく得ることが出来る虹彩色素上皮細胞 (IPE) を RPE の代用細胞とする方法が臨床応用されようとしている。しかし IPE はその機能についてはほとんど検討されておらず、特に膜チャネルコンダクタンスは全く報告がないことから、膜チャネルコンダクタンスの面から RPE と比較し、その特徴を明らかにしようとしたものである。また RPE に主に発現しその膜の性質を代表している特殊な内向き整流性カリウムチャネル (Kir) である Kir7.1 サブユニットが IPE に発現しているかを合わせて検討している。

一般にはウシ眼球細胞を用いるが、今回はそれが利用できないことからブタ眼球より急性単離した IPE および RPE を用い、電位固定によるホールセルパッチクランプ法を用いて細胞膜全電流を計測した。膜通過全電流は IPE, RPE とも内向き整流性を示し、5 mM Ba^{2+} を含む外液にて内向き整流性電流を阻害し、その差を Kir 電流として測定された。さらに Kir7.1 チャネルは他の Kir チャネルに比べ特異な性質を有しており、それは弱い整流性、弱い細胞外 K^+ 濃度依存性、そして本来通過しにくい Rb^+ に対する高い透過性を示すことから、細胞外液の K^+ 濃度を変化させ、Kir 電流の K^+ 濃度依存性を調べている。 K^+ および Rb^+ イオンに対する透過性も検討した。一方 IPE および RPE より Kir7.1 mRNA の存在を RT-PCR 法により検討し、IPE より得られた増幅産物を direct sequence 法により human Kir7.1 mRNA との相同性を検討した。これらの方法は妥当な研究の推進方法である。

結果は論文に示されている通りである。

本研究から IPE では主として Kir チャネルが機能的に発現していることを始めて報告した。さらにそれは RPE に特異的かつ優位に発現している膜チャネルである Kir7.1 であることが分子生物学的にも判明した。しかしその機能的発現は RPE の 10 分の 1 以下であり、網膜下での RPE と同程度の機能を果たしていると考えerことは困難で、IPE を網膜下に移植した場合、膜チャネルの面からは RPE の機能を代用することは出来ないと考えられることを示した。もしこの方法を臨床に応用するとすれば、膜機能の面からは今後 Kir7.1 チャネルの発現制御などを検討する必要があることを示している。

本研究は新しい事実を発見し、博士論文として十分価値があると評価された。さらに指摘された部分も訂正が加えられており、問題ない。